

0-734001-|

УДК631.504.53.575.224

На правах рукописи

КРУГЛОВА Зульфия Фенуновна

**ГЕНОТОКСИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ СТОЧНЫХ ВОД И ОСАДКОВ
КАК СОСТАВНАЯ ЧАСТЬ ИХ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ
ХАРАКТЕРИСТИКИ**

03.00.07 - микробиология

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**



КАЗАНЬ-2003

Работа выполнена на кафедре микробиологии Казанского
государственного университета им. В.И. Ульянова-Ленина

Научный руководитель: доктор биологических наук,
профессор Ильинская О.Н.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор Ившина И.Б.

доктор ветеринарных наук
профессор Госманов Р.Г.

Ведущее учреждение: Институт экологии
природных систем АН РТ

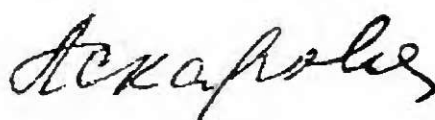
Защита состоится 13 марта 2003г. в 14³⁰ часов на заседании
Диссертационного Совета Д.212.081.08 при Казанском государственном
университете им. В.И. Ульянова-Ленина, 420008 г. Казань, ул.
Кремлевская, 18

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского
государственного университета

Автореферат разослан 29 января 2003г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доцент



Аскарова А.Н.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Одной из глобальных проблем современности является загрязнение окружающей среды, в результате которого происходит деградация биосферы. В число наиболее опасных загрязнителей входят генотоксиканты, которые, нарушая генетические структуры и процессы, могут привести виды к вырождению и вымиранию [Дубинин, 1985; Соколовский, Жуков, 1982; Ames, 1971]. Действие их на человека приводит к увеличению частоты наследственных, онкологических заболеваний, снижению иммунитета [Бочков, 1995]. Однако в таких объектах, как вода, почва, воздух, действуют не индивидуальные соединения, а целый комплекс, который, модифицируя отдельные составляющие, усиливает его мутагенный потенциал. В последние годы обнаруживают необходимость комплексного подхода к оценке генотоксичности [Saffiotti 1983; Watanable et al, 2000; Павленко с соавт., 1984].

Рядом авторов обнаружено, что в целом мутагенность сточных вод сохраняется на относительно высоком уровне даже после полной обработки в отстойниках [Blevins 1990; Coinbrao, 1992; Mao et al 1994]. Осадки сточных вод, образуемые после очистки вод, характеризуются высоким содержанием органического вещества, что ставит их в один ряд с некоторыми природными удобрениями. Однако, наряду с хорошими агрохимическими свойствами, осадки могут содержать опасные соединения, как тяжелые металлы, бенз(а)пирен, гексахлорциклогексан и др. [Sommers, 1977; Castadi, Ford, 1996]. После дезинфекции сточных вод и осадков сточных вод могут образовываться токсические вещества, которые, взаимодействуя с природной водой, могут приводить к накоплению этих веществ в донных отложениях даже в том случае, если содержание их в жидкой фазе незначительно [Орлов, Садовникова, 1996].

Следует отметить, что в настоящее время генотоксический контроль за качеством воды не предусмотрен. Научные исследования генотоксичности воды не носят мониторингового характера [Флеров, Ковалева, 1996; Крылова, Томилина, 2000]. Таким образом, актуально и важно оценивать не только существующую на сегодняшний день токсичность, но и отдаленные последствия использования химикалий.

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования являлось выявление генотоксического потенциала сточных вод и их осадков и

установление возможных корреляционных закономерностей между показателями содержания определенных химических веществ, токсического и геном – повреждающего действия этих комплексных образцов. В задачи работы входило следующее:

1. Охарактеризовать муниципальные сточные воды г. Казани на входе и на выходе из очистных сооружений по содержанию химических веществ, токсическому и генотоксическому действию.
2. Определить содержание тяжелых металлов и наиболее опасных органических соединений в образцах осадков сточных вод с иловых площадок и насосной станции очистных сооружений г. Казани; установить возможную связь аналитических показателей с экспериментально установленной токсичностью и генотоксичностью осадков сточных вод.
3. Установить характеристические параметры (аналитические показатели, токсичность, генотоксичность) донных отложений и вод непосредственно в месте сброса муниципальных сточных вод, а также выше и ниже по течению р. Волга для обнаружения закономерностей распределения мутагенного потенциала сточных вод в природных условиях.
4. Экспериментально обосновать генетическую опасность хлорирования сточных вод как процедуры, приводящей, помимо обеззараживания, к росту мутагенного потенциала воды.
5. На основании расчета корреляционных зависимостей между экспериментальными данными химического анализа и биотестирования на токсичность и мутагенность подтвердить необходимость введения показателя генотоксикологического контроля в систему мониторинга качества воды.

Научная новизна. В настоящей работе впервые получены экспериментальные данные, отражающие генотоксический потенциал сточных вод и их осадков с муниципальных очистных сооружений г. Казани. Участие различных химических веществ в генотоксическом воздействии на объекты окружающей среды не вызывает сомнений. Однако, выявление наиболее оптимального метода обнаружения суммарной генотоксичности, применение его в значительном масштабе для диагностики качества вод до сих пор не используется. Автором составлена и апробирована методическая схема

выявления генотоксичности вод и осадков. Показано, что достаточно полно характеризует мутагенный эффект образцов тест Эймса с использованием метаболической активации и без нее, проводимый для водных проб и экстрактов в эфире/ДМСО. Установлено, что сточная вода, прошедшая многоступенчатую обработку и хлорирование, может не только сохранять, но и даже усиливать мутагенный потенциал. В осадках сточных вод, которые планируются к использованию в качестве удобрений в сельском хозяйстве, также обнаружена генотоксичность, что может вызвать последующее накопление мутагенного потенциала в растениях. Выявлено, что вещества, аккумулирующиеся в донных отложениях, сохраняют генотоксический потенциал. При этом экспериментальные данные, полученные в работе, исключают возможность уменьшения мутагенности донных отложений при удалении от места сброса сточных вод.

Экспериментально подтверждено, что корреляция между химическими показателями, характеризующими образцы вод и их осадков, и показателями биотестирования, такими, как токсичность и генотоксичность, отсутствует.

На основании полученных данных можно рекомендовать введение генотоксического показателя в разряд обязательных норм качества воды во избежание опасных генетических последствий.

Практическая значимость. Тестирование сточных вод и других сложных объектов позволяет охарактеризовать исследуемые образцы по комплексу токсических и генотоксических показателей; такие данные могут быть полезными для разработки рекомендаций по оптимизации норм сброса (ПДС) для промстоков различных водопотребляющих предприятий и более полной характеристики биологического действия стоков при обосновании генетических безопасных предельно допустимых концентраций (ПДК) содержащихся в них веществ. Полученные результаты дают возможность создания примерной картины распространения генетической опасности, вносимой в окружающую среду сточными водами. Оценка значимости дополнительной нагрузки генотоксикантов на природные объекты, обладающие собственным фоновым уровнем генотоксичности, невозможна без учета генотоксических свойств муниципальных стоков, проведенного в настоящей работе. Более того, использованная в работе схема тестирования водных

образцов и органических экстрактов сточных вод и осадков готова к масштабному практическому применению.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на Итоговых конференциях КГУ (Казань, 2000-2002); IV научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Республики Татарстан (Казань, 2001); 39-ой международной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2001); Международном симпозиуме «Новые микробиотесты для стандартного токсикологического скрининга и биомониторинга» (Brno, Czech Republic, 1998); Научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Республики Татарстан, (Казань, 1998); II Республиканской научной конференции молодых ученых и специалистов (Казань, 1996).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 работ, из них 4 статьи и 5 тезисов на конференциях различного уровня. Разработка методик анализа отражена в научно-методическом пособии.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов экспериментов, их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 110 страницах машинописного текста, содержит 20 таблиц, 9 рисунков. Библиографический указатель включает 152 наименования, из них 58 работа зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы. Исследовали сточные воды (СВ) и осадки сточных вод (ОСВ) с очистного сооружения КП «Водоканал» г. Казани в период с 1997 по 2000 год в летне-осенний период (рис.1), донные отложения (ДО) отобранные в 2001 в зонах смешения сточных и природных вод в районе рассеивающего выпуска Казанских городских очистных сооружений Куйбышевского водохранилища.

Образцы СВ отбирались на входе (Вх1, Вх2, Вх3 - точка А) в очистное сооружение, после биологической очистки (Вых4(СГ) - точка В), после химической очистки (Вых4(СГ⁺) - точка С), и на выходе из очистного сооружения (Вых1, Вых2, Вых3 - точка С).

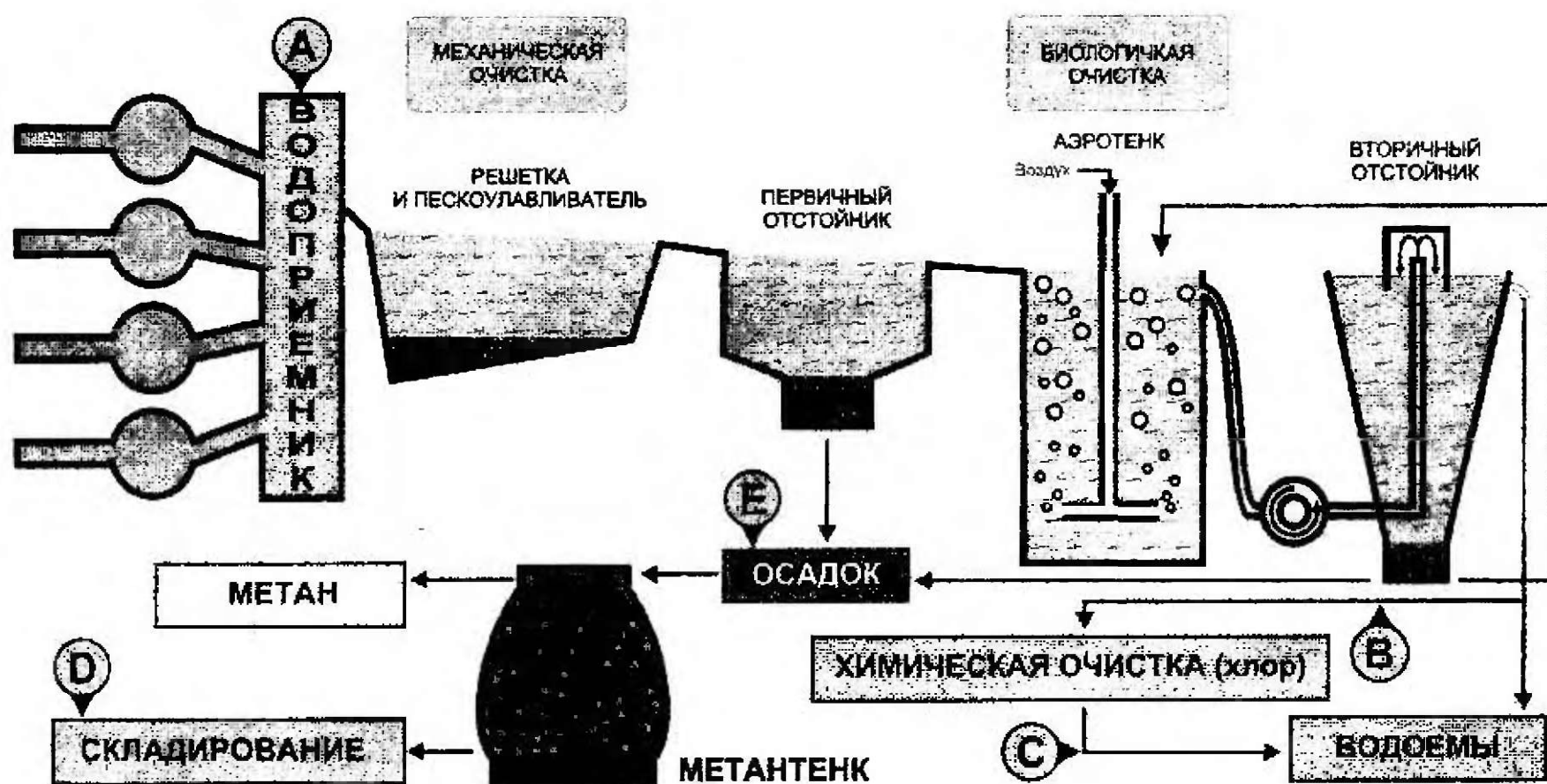


Рис.1 Схема мест отбора проб с очистного сооружения КП «Водоканал», г. Казань. А – точка отбора образцов СВ на входе; В – точка отбора образцов СВ на выходе до химической очистки; С – точка отбора образцов СВ после химической очистки; D – точка отбора образцов ОСВ с иловых карт; Е – точка отбора образцов ОСВ с насосной станции.

Дополнительно исследовались СВ локального очистного предприятия «Оргсинтез» (Орг^- , Орг^+ , Оргч) с использованием методического приема концентрирования (Орг^- , Орг^+) и экстракции CCl_4 (Оргч).

Образцы ОСВ отбирались с насосной станции (Ос4, Ос5 – точка Е) экстрагировали водой (Ос4в, Ос5в), системой эфир/ДМСО (Ос4э, Ос5э), CCl_4 (Ос4ч, Ос5ч), $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}$ (Ос4х, Ос5х), а также с иловых карт (Ос1, Ос2, Ос3 – точка D), образцы экстрагировали водой (Ос1в, Ос2в, Ос3в) и системой эфир/ДМСО (Ос1э, Ос2э, Ос3э). В тестах на токсичность и мутагенность исследовались все экстракты отобранных проб. Образцы донных отложений (ДО) отбирались из зоны смешения сточных и природных вод: район выпуска СВ (ДО1в, ДО1э), 800 м выше выпуска (ДО2в, ДО2э), 1 км выше водозабора (ДО3в, ДО3э), 500 м ниже выпуска (ДО4в, ДО4э), 4,7 км ниже выпуска (ДО5в, ДО5э). В тестах на мутагенность исследовались водные и эфирные вытяжки отобранных проб. Дополнительно исследовалась вода отобранная в этих же точках (В1, В2, В3, В4, В5).

Объекты, использованные в тестах на токсичность и генотоксичность:

- *Daphnia magna*, *Paramecia caudatum*-токсичность (Министерство экологии и природных ресурсов РТ);
- *Salmonella typhimurium*-токсичность, генотоксичность-штамм TA 100 - *his* G46, *rfa*, *uvr*, *pKm101*, *bio*⁻; штамм TA 98 - *his* D3052, *rfa*, *pKm101*, *uvr*, *bio*⁻ (Институт по БИХС, г. Купавна);
- *Escherichia coli* - генотоксичность - *wpr*⁻ *trp* E, «дикий тип»; *pol* A⁻ - *trp*⁻ 65, *sul*, *mal* A, *pol* A; *uvr* A⁻ - *trp*⁻ 65, *sul*, *uvr* A 155; *rec* A⁻ - *trp*⁻ 65, *rec* A (ГосНИИ Генетики, г. Москва).

Лиофилизированные микросомные (S9) фракции печени крыс и плаценты человека предоставлены институтом экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН Г. Перми.

Химические методы. Химические анализы образцов СВ и ОСВ проводили на базе Министерства экологии и природных ресурсов РТ совместно с лабораторией аналитического контроля согласно перечню стандартных методик внесенных в государственный реестр методик количественного анализа на 01.09.98 г. для сточных вод, почв и отходов [Государственный реестр методик..., 1998].

Количественное содержание гистидина в образцах определяли по методу, разработанному Ильинской и др. [2001]. Минимальная обнаруживаемая данным методом концентрация гистидина составляет 7мкг/мл. Доза гистидина, необходимая для удвоения ревертантов, равна 232мкг/мл [Nylund, Einisto, 1993].

Санитарно-бактериологические методы. Для выявления санитарно-показательных микроорганизмов в ОСВ использовали стандартные методы посева на питательные среды для определения коли- и перфрингенс-титра [Черкес, 1982; Захарова, Сайманова, 1982].

Методы биотестирования. Токсикологический анализ образцов выполняли в соответствии с государственными нормативными документами и в соответствии с методиками, прошедшими государственную метрологическую экспертизу [свидетельство ПНДФ Т 14:1:2:3:4 3-99 для *Daphnia magna*, ПНДФ Т 01.19.229/2000 для *Paramecia caudatum*]. Оценку токсичности образцов ОСВ проводили путем сравнения числа колоний тестерных штаммов *Salmonella typhimurium* в опытных вариантах, содержащих исследуемые образцы, и

контрольных содержащих эквивалентное количество растворителя [Ильинская с соавт., 1995].

Для выявления прямых повреждений ДНК использовали тест, основанный на избирательной ингибиции роста штаммов *E. coli: pol A⁻, uvr A⁻, rec A⁻*, дефектных по определенным генам, участвующим в репарации, в сравнении с ростом штамма дикого типа *wr²* [Абилев, Порошенко, 1986].

Мутагенное действие образцов оценивали в тесте Эймса по регистрации частоты реверсии ауксотрофных по гистидину штаммов *Salmonella typhimurium* TA98 и *Salmonella typhimurium* TA100 к прототрофности в вариантах с метаболической активацией микросомами печени крыс и без нее. Мутагенную активность учитывали по кратности превышения числа индуцированных ревертантов над спонтанным фоном мутирования [Maron, Ames, 1983].

Статистическая обработка результатов. Результаты обрабатывали с помощью стандартных математических методов в компьютерной программе Microsoft Excel 2000, рассчитывая среднее значение данных в каждой группе из трех независимых экспериментов. Приведенные в работе значения являются средними расчетными, среднеквадратическое отклонение не превышает 15% ($\sigma \leq 15\%$). Разницу двух групп данных считали достоверной, если критерий вероятности соответствовал $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Содержание органических и неорганических веществ в образцах сточных вод и их осадков.

Превышение нормативных показателей для СВ было показано для железа, алюминия, азота нитритов, меди, СПАВ, кобальта, нефтепродуктов, формальдегида, цинк, фторидов. Обнаружено превышение нормативных показателей для азота аммонийного, железа, никеля. Превышение нормативных показателей для образца СВ с завода «Оргсинтез» было обнаружено для алюминия и нефтепродуктов. Представленные результаты сравнивались с показателями, допускаемыми ГОСТом.

Суммируя полученные данные химического анализа ОСВ, можно сказать, что в разных образцах наблюдалось превышение норм по различным показателям, например для ОСВ – никеля, хрома; кроме того, бенз(а)пирена,

ДДТ, нефтепродуктов. По химическим показателям осадки городских сточных вод представляют потенциальную опасность для всех компонентов окружающей среды.

Результаты химического анализа ДО показали, что образцы содержат большой спектр химических соединений, нормативные документы для которых, не разработаны.

Результаты химического анализа воды (В), отобранной в этих же точках, показал, что имеются превышения нормативных показателей например, по кадмию (В1, В2, В3), марганцу (В1, В2, В4, В5), аммиаку (во всех точках), хлоридам (во всех точках), цинку (В1), никелю (В2, В4) и сульфатам (В4).

Таким образом, превышение ряда нормативных показателей для воды как сточной, так и природной, выявлено неоднократно.

1.1. Содержание свободного гистидина в образцах СВ и ОСВ

Сравнивая хроматографические пластинки со стандартными растворами гистидина и образцами проб, обнаружили наличие гистидина в образцах Ос1 (около 20 мкг/мл) в Ос2 и Ос3 (около 10 мкг/мл). Остальные образцы гистидина не содержали. Однако, это количество гистидина, не влияет на результаты теста, так как концентрация гистидина находится ниже критической, необходимой для удвоения ревертантов (232 мкг/мл). Следовательно, мутагенность водных экстрактов ОСВ, зафиксированная в тесте, не является артефактом. Образцы сточных вод не содержали свободного гистидина, даже в минимальной выявляемой методом концентрации (7 мкг/мл).

2. Показатели загрязненности осадков сточных вод согласно коли- и перфрингенс-титру.

Согласно Захаровой и Саймановой [Захарова, Сайманова, 1982], исследуемые пробы ОСВ можно охарактеризовать как «сильно загрязненные». Коли – титр был равен 4, на среде Эндо выросли колонии с металлическим блеском, грамотрицательные, оксидаза-отрицательные палочки.

Результаты эксперимента по определению перфрингенс-титра исследуемых образцов показали наличие газообразования и, вследствие этого, разрывов в среде Вильсон - Блера при разведениях: 10^{-1} , 10^{-2} образцов осадков сточных вод, наличие грамположительных палочек со спорами в мазках, приготовленных из колоний. Таким образом, исследуемые на наличие

Clostridium perfringens пробы можно охарактеризовать как «слабо загрязненные». Рекомендуется применить дополнительную обработку осадков для уменьшения количества микроорганизмов до допустимых норм (практикуются термическая обработка, химическое обеззараживание, известкование, применение металлокомплексов активно реагирующих с белками [Шемякина с соавт., 1995]).

3. Токсикологические эффекты исследуемых образцов.

При исследовании СВ на гидробионтах *Paramecium caudatum* и *Daphia magna* получены следующие результаты: образцы Вх 1, Вых 1, Вых 4 (СІ⁻), Орг не обладали острой токсичностью; Вх 2, Вых 2 - обладали острой токсичностью для устранения которой необходимо разбавление в 2 раза; Вх 3, Вых 3 - обладали острой токсичностью, необходимо разбавление в 3 раза; Вых 4 (СІ⁺) обладал острой токсичностью, необходимо разбавление в 1,4 раза. Показано, что токсичность проб Вых2 и Вых3 не уменьшалась после прохождения очистных сооружений; а для пробы Вых 4 (СІ⁺) даже возросла.

Результаты исследования ОСВ на токсичность показали, что максимальное угнетение роста бактерий (до 75%) вызывали образцы, приготовленные в органических растворителях. Выживаемость бактерий без ОСВ приняли за 100%. Наибольшей токсичностью обладал эфирный экстракт образца осадка, перерастворенный из эфирного экстракта в ДМСО (Ос4э), а наименьшей токсичностью обладала вытяжка нативная – то есть собственно водная фаза осадка (табл. 1). Это позволяет предположить, что основной вклад в токсическое действие осадка вносят органические соединения.

В целом можно заключить, что ни одна из исследуемых проб не обладала ярко выраженным токсическим эффектом, что позволило нам исследовать данные экстракты на мутагенность, поскольку известно, что выживаемость штамма на уровне 3% от контроля достаточна для тестирования вещества на генотоксичность [Фонштейн, 1985].

При исследовании ДО и В на гидробионтах *Paramecium caudatum* и *Daphia magna* показано, что только один образец воды (В5) проявил токсичность, для устранения которой требуется разбавление в 2,8 раза.

Таблица 1

Выживаемость тестерных штаммов *Salmonella typhimurium* ТА 98 под действием экстрактов ОСВ

| Образец | Выживаемость, % * |
|---------|-------------------|
| Ос1в | 89,8 |
| Ос2в | 94,1 |
| Ос3в | 94,9 |
| Ос4в | 72,0 |
| Ос5в | 75,0 |
| Ос1э | 88,7 |
| Ос2э | 75,5 |
| Ос3э | 68,7 |
| Ос4э | 19,0 |
| Ос5э | 68,3 |
| Ос4ч | 25,0 |
| Ос4х | 27,0 |
| Ос5ч | 30,0 |
| Ос5х | 31,5 |

* Выживаемость бактерий без ОСВ приняли за 100%

Таким образом, СВ и ОСВ, особенно органические экстракты последних, были более токсичными, чем речные ДО и В. Сбрасываемые СВ не оказывают токсического влияния на ДО и речную воду, за исключением образца В5, токсичность которого обнаруживалась, вероятно, в результате влияния вод завода «Органического синтеза», сброс которых происходит выше по течению от места взятия образца. Естественно, что обнаружение острой токсичности речной воды или донных отложений является особенно неблагоприятным показателем, свидетельствующем об истощении ресурсов биоциноза, работа которого приводит к естественному самоочищению водоемов. Наши анализы подтвердили, что такая ситуация, хотя и однократно наблюдаемая, возможна для исследуемой зоны р. Волги.

4. ДНК – повреждающая активность образцов СВ и ОСВ

Результаты ДНК – повреждающего теста показали, что проба воды на входе в очистное сооружение (Вх1) не имеет ДНК – повреждающей активности, а на выходе (Вых1) для *rec A* штамма и для *uvr A* штамма имеют слабую ДНК – повреждающую активность. Угнетение роста 4 % и 6 % соответственно. Пробы воды Вх2 и Вых2, которые также

концентрировались выпариванием при 37°C, ДНК – повреждающей активности не проявили (табл.2).

Таблица 2

Угнетение роста (%) дефектных по репарации штаммов *E.coli* под действием образцов воды на входе и выходе из очистного сооружения.

| | <i>recA</i> ⁻ | <i>polA</i> ⁻ | <i>uvrA</i> ⁻ |
|----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Вх1 | 100,7±4,00 | 98,77 ± 2,50 | 100,97±7,50 |
| Вых1 | 95,89±0,05* | 101,30±2,71 | 93,88±1,02* |
| Вх2 | 109,50±5,11 | 108,50±6,00 | 98,98±1,75 |
| Вых2 | 106,10 ± 4,45 | 112,70 ± 10,00 | 104,50 ± 4,05 |
| кон.Вх2 | 105,50 ± 5,10 | 108,50 ± 6,00 | 98,98 ± 1,75 |
| кон.Вых2 | 104,10 ± 2,44 | 111,70 ± 10,00 | 103,50 ± 4,05 |
| Вх3 | 91,49 ± 2,41* | 127,70 ± 12,54 | 107,20 ± 5,00 |
| Вых3 | 95,94 ± 0,75* | 107,80 ± 4,25 | 93,70 ± 1,85* |

* - Достоверно отличается от 100% ($p \leq 0,05$). За 100% принята выживаемость штамма дикого типа (wp^2).

Таким образом, методический прием с концентрированием указанных проб не выявил веществ, обладающих способностью повреждать ДНК. Результаты пробы Вых3 обнаруживают угнетении роста бактерий для мутантных штаммов *recA* и *uvrA* на 3%.

На входе (Вх3) угнетение роста не наблюдается. Полученные величины угнетения роста бактерий довольно незначительны, что позволяет говорить о малой концентрации веществ, повреждающих ДНК, в исследуемых пробах.

Оценку ДНК-повреждающего действия ОСВ проводили для всех водных экстрактов. Полученные данные свидетельствуют, что образцы ОСВ не обладали ДНК - повреждающей активностью.

5. Прямое и не прямое мутагенное действие образцов

При оценке мутагенной активности образцов СВ в тесте Эймса, показано, что число колоний – ревертантов в опыте и контроле достоверно различаются менее чем в 2,5 раза, следовательно образцы СВ Вх1, Вх2, Вых2, Вх3 мутагенной активностью не обладают. Однако наблюдали превышение спонтанного фона мутирования штамма ТА 98 при анализе проб на выходе из очистного сооружения: для образцов Вых1 в 2 раза, для Вых3 в 2,3 раза и для Орг+ в 16,6 раз, что говорит о мутагенности проб. Для штамма

ТА 100 зафиксировали превышение числа колоний – ревертантов в опыте для обеих проб воды Вых1 и Вых3 в 2,4 раза (табл.3). Анализ мутагенности исследуемых проб хлорированной и нехлорированной воды выявил, что хлорирование повышает мутагенный потенциал: число колоний - ревертантов в опыте и негативном контроле достоверно различаются более чем в 3,5 раза.

Таблица 3

Мутагенная активность СВ на штаммах *Salmonella typhimurium* ТА98 и ТА100.

| Образец | Число ревертантов на чашку* | | Превышение над спонтанным фоном (число раз) | |
|--------------------------------|-----------------------------|-------|---|-------|
| | ТА98 | ТА100 | ТА98 | ТА100 |
| Вх1 | 6,00 | 13,50 | - | 1,42 |
| Вх2 | 17,50 | 9,50 | 1,09 | - |
| Вх3 | 20,00 | 16,00 | 1,25 | 1,60 |
| Вых1 | 32,00 | 23,00 | 2,00 | 2,40 |
| Вых2 | 28,00 | 7,50 | 1,70 | 1,20 |
| Вых3 | 36,00 | 23,00 | 2,25 | 2,40 |
| Орг | 35,00 | 18,50 | 2,10 | 1,90 |
| Орг+ | 50,00 | - | 16,60 | - |
| Орг _ч | 3,00 | - | - | - |
| Контроль ССl ₄ | 3,50 | - | - | - |
| Контроль Н ₂ О дис. | 16,00 | 9,50 | - | - |

Не хлорированный образец мутагенной активностью не обладал, превышение числа колоний – ревертантов над спонтанным фоном составило 1,9 раза (табл.4). Результаты экспериментов по анализу мутагенности исследуемых проб ОСВ (табл.5) показали, что число колоний - ревертантов в опыте и негативном контроле (на растворитель) достоверно различаются более чем в 2,5 раза.

Таблица 4

Мутагенная активность СВ на штаммах *Salmonella typhimurium* ТА100

| Образец | Число ревертантов на чашку* | Превышение над спонтанным фоном (число раз) |
|-------------------------|-----------------------------|---|
| Вых4 (Cl ⁻) | 50,5 | 1,9 |
| Вых4 (Cl ⁺) | 93 | 3,5 |
| Контроль вода (дист.) | 26,5 | |

Таблица 5

Мутагенная активность ОСВ на штамме *Salmonella typhimurium* TA98 без метаболической активации.

| Образец | Число колоний/чашку* | Превышение над спонтанным фоном, число раз |
|---|----------------------|--|
| Ос1в | 78 | 1,55 |
| Ос2в | 156 | 3,11 |
| Ос3в | 163 | 3,26 |
| Ос4в | 1510 | 30,20 |
| Ос1э | 330 | 6,59 |
| Ос2э | 432 | 8,64 |
| Ос3э | 591 | 11,82 |
| Ос4э | 510 | 10,20 |
| Ос4ч | 38 | 0,75 |
| Ос4х | 138 | 2,75 |
| ДМСО (контроль) | 83 | 1,65 |
| H ₂ C ₂ Cl (контроль) | 95 | 1,90 |
| CCl ₄ (контроль) | 63 | 1,25 |
| Спонтанный фон(вода) | 50 | 1,00 |
| НММ (контроль) | 225 | 4,50 |
| Нативная вытяжка | 88 | 1,75 |

*Представлены средние значения трёх независимых экспериментов. Среднеквадратическое отклонение в группе не более 15% ($\sigma \leq 15\%$).

Следовательно, образцы ОСВ водной вытяжки проявили слабый мутагенный эффект. Самый высокий мутагенный эффект обнаружен для образца Ос4в – число колоний индуцированных ревертантов в 30,2 раза превышает спонтанный фон мутирования. Известно, что в водную фракцию переходят в основном неорганические вещества, в том числе и тяжелые металлы. Практически все эфирные образцы проявили мутагенную активность. Среди органических вытяжек наибольшим эффектом обладал образец Ос4э. Вероятно, данная система экстракции эфиром/ДМСО является оптимальной для выделения органических компонентов, обладающих мутагенной активностью.

Таким образом, эфирными вытяжки ОСВ обладали более высокой мутагенной активностью по сравнению с водными. В целом можно заключить, что в окружающей среде ОСВ являются слабо мутагенными.

ОСВ также исследовались в тесте Эймса с метаболической активацией (табл.6).

Таблица 6

Мутагенная активность ОСВ на штаммах *Salmonella typhimurium* TA98 и TA100 с метаболической активацией.

| Образец | Число ревертантов на чашку* | | Превышение над спонтанным фоном (число раз) | |
|---------------|-----------------------------|-------|---|-------|
| | TA98 | TA100 | TA98 | TA100 |
| Ос1в | 34 | 73 | 1,00 | 1,00 |
| Ос2в | 51 | 102 | 1,50 | 1,40 |
| Ос3в | 51 | 104 | 1,50 | 1,43 |
| Ос1э | 1000 | 114 | 33,33 | 1,62 |
| Ос2э | 800 | 119 | 26,66 | 1,70 |
| Ос3э | 920 | 99 | 30,66 | 1,41 |
| Контроль ДМСО | 30 | 70 | - | - |
| Контроль вода | 34 | 73 | - | - |

*Представлены средние значения трёх независимых экспериментов. Среднеквадратическое отклонение в группе не более 15% ($\sigma \leq 15\%$).

Модификация теста Эймса с метаболической активацией *in vitro* используется для выявления генотоксического действия промутагенов, которые могут модифицироваться в живом организме в мутагены под действием системы микросомного окисления, содержащей цитохром Р450 в результате связывания вещества компонентами активирующей смеси.

Результаты тестирования осадков с метаболической активацией показали, что метаболическая активация *in vitro* водных экстрактов исследуемых проб не увеличивала, а, напротив, немного понижала их мутагенную активность как на штамме TA98, так и на TA100. Водные экстракты были немутагены на обоих штаммах. На штамме TA100 в вариантах с метаболической активацией эфирных экстрактов также происходило снижение уровня мутагенности исследуемых проб. Однако на штамме TA98 было зафиксировано резкое увеличение мутагенности эфирных экстрактов: Ос1э, Ос2э, Ос3э вызывали увеличение уровня мутирования тестерных штаммов в 33,33; 26,66; 30,66 раз соответственно, что характеризует их как мутагены средней силы действия. Таким образом, метаболическая активация увеличивала мутагенность эфирных, но не водных вытяжек проб осадков сточных вод, что, однако, не уменьшает потенциальной опасности осадков для окружающей среды.

Так как в водную фракцию переходят в основном неорганические вещества (в том числе и тяжелые металлы), то представляется естественным

отсутствие увеличения мутагенности водной вытяжки вследствие метаболической активации. Эфирная же фракция, напротив, содержит органические соединения, которые становятся мутагенами лишь после метаболической активации. Полученные данные свидетельствуют о том, что большинство исследованных образцов содержит мутагенные вещества, как прямого действия, так и промутагены, проявляющие активность после метаболической активации.

Результаты исследований на мутагенную активность ДО показал, что эфирные образцы, взятые в районе 800 м выше выпуска (ДО2э), 1 км выше водозабора (ДО3э) и 4,7 км ниже выпуска (ДО5э), обладали высокой мутагенной активностью (табл.7). Превышение числа колоний-ревертантов над спонтанным фоном составило 13,9; 20,5; 6,3 раза соответственно. Водные экстракты образцов, отобранные на выпуске СВ (ДО1в) также обладали мутагенной активностью; - превышение спонтанного фона составило 2,0 раза.

Мы не считаем правомочным говорить о связи мутагенности ДО с мутагенностью СВ на основании данных анализа.

Таблица 7

Мутагенная активность ДО на штаммах *Salmonella typhimurium* TA100.

| Образец | Число ревертантов на чашку* | Превышение над спонтанным фоном (число раз) |
|---------------|-----------------------------|---|
| ДО1э | 10,5 | 1,1 |
| ДО2э | 132 | 13,9 |
| ДО3э | 195 | 20,5 |
| ДО4э | 6 | - |
| ДО5э | 60,5 | 6,3 |
| ДО1в | 53 | 2,0 |
| ДО2в | 20 | - |
| ДО3в | 8,5 | - |
| ДО4в | 42,5 | 1,6 |
| ДО5в | 14,5 | - |
| Контроль ДМСО | 9,5 | - |
| Контроль вода | 26,5 | - |

*Представлены средние значения трёх независимых экспериментов. Среднеквадратическое отклонение в группе не более 15% ($\sigma \leq 15\%$).

Однако вряд ли можно объяснить наличие генотоксичности ДО (ДО2э, ДО3э, ДО5э, ДО1в-табл.7) присутствием «естественных» мутагенов-то есть мутагенов неантропогенного происхождения, тем более ряд образцов ДО не обнаружили мутагенного эффекта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном разделе мы сочли возможным не только обобщить данные, но и провести корреляционный анализ зависимостей исследованных нами показателей генотоксичности с токсикологическими и химическими характеристиками.

Генотоксическое состояние СВ

Изучение генотоксического состояния СВ показало, что генотоксические эффекты СВ – динамический показатель, меняющийся в зависимости от времени взятия образцов. Так, образцы на выходе из очистного сооружения были отобраны с интервалом две недели в летний сезон. В частности, образец Вых1 взятый на выходе из очистного сооружения КП «Водоканал» обладал генотоксическим эффектом»; Вых2 - таковой эффект отсутствовал; Вых3 – генотоксичность обнаруживали вновь в тесте Эймса (табл.3). Эти же образцы имеют и слабое ДНК-повреждающее действие, причем для исправления наносимых повреждений необходимо участие репарирующих ферментов, кодируемых генами *hcs A* (постреплекативная репарация) и *uvrA* (эксцизионная репарация) (табл.2). Важно отметить, что эти образцы имели превышение ПДС по азоту аммонийному, азоту нитратов, кобальту, нефтепродуктам – Вых1, Вых2, Вых3; формальдегиду – Вых2; Вых3; и токсичность обнаруживалась для образцов Вых2 (кратность разведения (Кр)=2) и Вых3 (Кр=3).

Образцы воды (Вх1; Вх2; Вх3) взятые на входе в очистное сооружение не обладали мутагенной активностью, хотя имели превышение ПДС по всем химическим показателям и обладали острой токсичностью.

Учитывая, что образцы были отобраны практически на протяжении месяца, следует рекомендовать для скрининга и установления закономерности по возможности частое тестирование, не менее трех раз в месяц.

Водные образцы (Орг) отобранные на выходе с очистного сооружения «Оргсинтез» обладали слабым генотоксическим эффектом, химические

показатели превышали ПДС по алюминию, нефтепродуктам и не обладали острой токсичностью. Методический прием концентрирования СВ упариванием приводил к повышению величины мутагенного эффекта с 2,10 до 16,6. В тоже время экстракция проб CCl_4 и последующие тестирование экстракта не выявило мутагенного эффекта, что делает данный метод неприемлемым в скрининге (табл.3).

Также важным оказалось установление того факта, что после очистки воды хлорированием мутагенность не снижалась, а возрастала – например, образец Вых4(Cl^-) не проявил мутагенности, а Вых4 (Cl^+) уже превышала спонтанный фон в 3,5 раза (табл.4). Эти образцы вод имели превышение по химическим показателям: азот аммонийный, никель, нефтепродукты, железо и Вых4(Cl^-) не обладал острой токсичностью, а после хлорирования Вых4(Cl^+) - обладал, для устранения этого показателя необходимо разбавление в 1,4 раза. Это лишний раз подчеркивает потенциальную опасность, связанную с очисткой воды хлорированием. Необходимо отметить, что все исследованные образцы СВ не содержали свободного гистидина, либо содержали его минимальное количество (менее 7 мкг/мл). Это позволяет считать результаты теста Эймса вполне достоверными.

Последствия попадания таких СВ в водоем может вызвать различные изменения биологического состава, аккумуляцию генотоксических компонентов во флоре и фауне и, как следствие, нарушение генетического постоянства среды.

Генотоксическое состояние ОСВ

Проведенный нами анализ генотоксического состояния ОСВ, взятых с очистных сооружений КП «Водоканал», показал, что образцы ОСВ с иловых карт как водные (Ос2в, Ос3в) так и эфирные (Ос1э, Ос2э, Ос3э) обладали мутагенным эффектом (табл.5). Вероятно, временное складирование и высушивание осадка уменьшает мутагенность, но не устраняет ее. Метаболическая активация эфирных (органическая составляющая), но не водных (неорганическая составляющая) экстрактов образцов вызывает увеличение мутагенности (табл.6), что отражает потенциальную опасность осадка для окружающей среды. Образцы ОСВ с насосной станции (Ос4в, Ос4э) содержали вещества, являющиеся мутагенами средней силы, превышение

спонтанного фона составило 30,2 и 10,2 раза - это подтверждает, что СВ содержат мутагенные вещества, часть которых аккумулируется и в ОСВ. Среди органических вытяжек наибольшим мутагенным эффектом обладал образец (Ос4э), полученный экстракцией эфир/ДМСО. Методический прием экстракции H_2C_2Cl и CCl_4 (Ос4х, Ос4ч) не является оптимальным для выделения органических компонентов, обладающих мутагенной активностью; превышение спонтанного фона составило 2,75 и 0,75 соответственно (табл.5). При этом все образцы ОСВ не являлись токсичными (табл. 1).

Нами охарактеризованы ОСВ в соответствии с положением (Положение (регламент)...,1986) по коли-титру и перфрингенс-титру как сильно и слабозагрязненные соответственно, результаты химического анализа показали присутствие в ОСВ ТМ, нефтепродуктов, ДДТ, бензопирена, ГХЦГ, фенолы.

Последствия применение ОСВ в качестве сельскохозяйственных удобрений могут быть чрезвычайно опасными. Рекомендуются захоронение проанализированных ОСВ, поскольку по химическим показателям, и показателям биотестирования ОСВ представляют потенциальную опасность. Наличие мутагенной активности чревато долгосрочными неблагоприятными последствиями. Хотя потеря мутагенного эффекта в динамике естественного хранения вполне возможна вследствие фильтрационных и метаболических процессов, возможен и обратный эффект – усиление генотоксичности из-за образования более опасных интермедиантов метаболизма. Следовательно, комплексное исследование ОСВ с применением анализов генотоксического действия образцов необходимо для сохранения природных экосистем и здоровья человека.

Генотоксическое состояние ДО

Характеристика генотоксичности ДО свидетельствует о широком мутагенном загрязнении грунтов исследованного участка Куйбышевского водохранилища.

Анализ пространственного распределения генотоксичности показал, что наиболее высокие уровни генотоксичной активности ДО относятся к участкам, подверженным значительному антропогенному загрязнению. Это в первую очередь район выше водозабора (ДО3э) и район 800м выше выпуска СВ (ДО2э): превышение спонтанного фона составило 20,5 и 13,9 раз, что говорит о

сильной мутагенной активности. Также в районе 4,7 км ниже выпуска (ДО5э) превышение спонтанного фона составило 6,3 раза, а в районе выпуска СВ (ДО1в) превышение спонтанного фона составило 2,0 раза, что говорит о слабой мутагенной активности (табл. 7). Результаты по выявлению генотоксичности не случайны, так как вблизи мест отбора образцов находятся промышленные и муниципальные предприятия, например, Казанский речной порт – возле точки ДО2; завод «Оргсинтез» - вблизи ДО5. Образцы, полученные экстракцией эфир/ДМСО, выявили больший мутагенный эффект, чем водные образцы (табл.5). Вероятно, генотоксические компоненты в основном имели органическое происхождение. Образцы донных отложений не обладали острой токсичностью, но содержали ТМ, например, ДО3 содержали цинк в количестве 20,7мг/кг. Для более полной характеристики были отобраны в тех же точках и водные образцы, которые не обладали острой токсичностью, кроме образца В2 ($K_p=2,8$), но по химическим показателям имели превышение ПДС: по нитратам (В1, В4, В5), хлоридам (В1, В2, В4, В5), марганцу (В1, В2, В4, В5), фенолам (В1).

Такая ситуация связана со способностью донных отложений накапливать генотоксические поллюанты (Minissi, 1998). Очевидно, что существует потенциальная опасность вторичного заражения волжской воды генотоксикантами. При этом полученные результаты исключают возможность снижения мутагенного потенциала ДО при удалении от конкретного места сброса СВ. Нами зарегистрировано наличие мутагенности ДО, не связанной напрямую с официально известной локализацией сброса СВ Казанских городских очистных сооружений.

Изучение корреляционной зависимости между химическими, токсикологическими и генотоксическими показателями

Корреляционный анализ химического, токсикологического, генотоксического показателей и расчет коэффициента корреляции представлен в табл.8.

Анализ показал, что между показателями не обнаружено практически никаких корреляционных зависимостей, что свидетельствует о необходимости проведения тестов, как на токсичность, так и мутагенность, независимо от результатов химического анализа. Ни токсичность, ни мутагенность, как

свидетельствуют результаты нашей работы, не могут быть предсказаны на основе данных химического анализа.

Таблица 8

Коэффициент корреляции генотоксических, токсических и химических показателей.

| Показатель | СВ | ОСВ | ДО |
|------------------|--------------|-------------|------------|
| Химич./Токсич. | 0,46768696 | 0,84493140 | - |
| Токсич./Гентокс. | - 0,32464855 | 0,03733142 | - |
| Гентокс./Химич. | - 0,20494924 | -0,30492897 | 0,51166706 |

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что муниципальные стоки КП «Водоканал» г. Казани в 1997-2002 гг. превышали нормы допустимого сброса по ряду аналитических показателей, в частности, по нефтепродуктам; обладали острой токсичностью на гидробионтах и проявляли слабую ДНК-повреждающую и мутагенную активность на выходе из очистных сооружений. На входе в очистные сооружения мутагенной активности не обнаружено.
2. Осадки сточных вод с иловых площадок и насосной станции очистных сооружений г. Казани в 1997 – 2000 гг. обнаружили превышение экспериментальных экологических нормативов по содержанию никеля, нефтепродуктов и в некоторых случаях бенз(а)пирена, свидетельствующее об аккумуляции генотоксикантов в осадках. При этом органические экстракты осадков незначительно подавляли рост микроорганизмов, но обладали мутагенностью. Водные экстракты осадков не проявляли генотоксичности.
3. Анализ донных отложений и воды р. Волга выше и ниже места сброса муниципальных сточных вод в 2001 г. подтвердил возможность проявления генотоксических эффектов воды и эфирных экстрактов донных отложений независимо от места взятия проб, что ставит под сомнение результативность теоретизирования географического распределения генотоксикантов.
4. Сточная вода, прошедшая многоступенчатую обработку и хлорирование, не только сохраняет, но и усиливает мутагенный потенциал, свидетельствующий о несовершенстве существующей сегодня технологии очистки сточных вод от генотоксикантов.

5. Апробирована методика тестирования сточных вод и экстрактов осадков на токсичность и генотоксичность с использованием ауксотрофных бактерий; при этом экспериментально показано отсутствие корреляции между аналитическими показателями, характеризующими химический состав сточных вод и осадков, и показателями биотестирования.

Публикации по теме диссертации.

1. Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Зеленихин П.В., Круглова З.Ф., Чойдаш Б., Эль-Регистан Г.И. Влияние аутоиндукторов анабиотического состояния бактерий на геном микробной клетки // Микробиология, 2002. - Т.71, №2.- С.164-168.
2. Круглова З.Ф., Ильинская О.Н. Характеристика генотоксичности муниципальных сточных вод / Матер. IV научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Республики Татарстан. Тезисы докладов. Естественнонаучное направление, Казань, 11-12 декабря 2001г. - 2001. - С.54.
3. Ильинская О.Н., Скипина И.М., Карамова Н.С., Иванченко О.Б., Круглова З.Ф., Шмит М.А. Определение свободного гистидина методом тонкослойной хроматографии // Клиническая и лабораторная диагностика, 2001. - № 6. - С. 12-14.
4. Круглова З.Ф., Мавзютова И.П. Сборник тестовых заданий в 3-х книгах «Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии», Казань: КБМК, 2001. - с.71.
5. Круглова З.Ф., Ильинская О.Н. Использование бактериальных тест – систем для оценки генотоксичности муниципальных сточных вод / Матер. 39 междунар. студ. конфер. «Студент и научно-технический прогресс», Биология, часть 2, Новосибирск, НГУ, - 2001. - С. 30-31.
6. Ivanchenko O.B., Pinskya O.N., Skipina I.M., Kruglova Z.F., Petrov A.M. Genotoxicity monitoring of natural environmental samples in Tatarstan // In: «New microbiotest for routine toxicity screening and biomonitoring», Ed. G.Persoone, C.Janssen, W.DeCoen, Kluwer Acad. Plenum Publishers, 2000.- P.511-516.
7. Ильинская О.Н., Круглова З.Ф., Петров А.М. Оценка генотоксических эффектов муниципальных сточных вод // Вестник Татарского отделения РЭА, 2000. - № 4. - С.12-16.
8. Ivanchenko O.B., Pinskya O.N., Skipina I.M., Shmidt M., Kruglova Z.F. Genotoxicity monitoring of natural environmental samples in Tatarstan / Abstr. of int. symp. on new microbiotest for routine toxicity screening and biomonitoring, June 1-3, 1998, Brno, Czech Republic. - P.43.

9. Круглова З.Ф., Ильинская О.Н. Разработка дополнительных критериев безопасности городских очистных сточных вод / Матер. научно-практической конференции «Актуальные проблемы экологии Республики Татарстан», Казань, КГТУ, 16 апреля 1998 г. – 1998. - С.29.

10. Мухаметова З.Ф. (Круглова), Крылова Н.И. Сульфатредуцирующие бактерии-деструкторы дибензотиофена / Матер. II Республиканской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов. Тезисы докладов. Биология. Биотехнология. Генетика, Казань, 28 июня-1 июля 1996г. - 1996.- С.83.